

## 卵黄からリン脂質の分離に関する研究

筒井 知己

## Studies on the Separation of Phospholipid from Egg Yolk

TOMOMI TSUTSUI

Lipoprotein and water-soluble proteins were separated from egg yolk with dextransulfate. 99.97% of the lipids were precipitated by this treatment. SDS-PAGE showed the presense of livetin in the supernatant. Phospholipid were collected from the precipitated lipoprotein by ether extraction.

リン脂質は、食品の乳化剤や化粧品の基本剤、医薬品の生物活性物質の原料として重要な物質である<sup>6)</sup>。中でも卵黄リン脂質は、大豆リン脂質より界面活性が強く、エマルジョンを形成しやすい特性をもっている<sup>2)</sup>。ところで卵黄からレシチンの製造では、生卵黄を一度熱風乾燥後、有機溶媒を用いて脂質を抽出するので、他の生物活性を有するタンパク質は変性を受け、その回収は困難となっている。しかし卵黄中には、ホスビチン、 $\alpha$ -リベチン、 $\beta$ -リベチン、 $\gamma$ -リベチン、ビオチン結合性タンパク質等の生物活性成分が含まれており、中でも $\gamma$ -リベチンは免疫グロブリンG様の抗体であることから、その利用が検討されている<sup>5)</sup>。そこで、今回は、卵黄から脂質を抽出するとともに、タンパク質を変性させずに回収する方法を企図した。

卵黄中のリン脂質の大部分はリポタンパク質の構成成分として含まれているので、まず卵黄からリポタンパク質を簡単に分離する方法を検討すると、従来の分離法では、卵黄溶液を遠心分離し、グラニュール（高密度リポ

タンパク質が主成分である）とプラズマに分け、このプラズマをさらに超遠心分離して低密度リポタンパク質を浮上させ分離している<sup>7)</sup>。しかしこの方法は長時間を要し、卵黄の多量処理も困難である。そこで著者はBurnsteinら<sup>1)</sup>が血清中のリポタンパク質の分離に用いているデキストランサルフェートを卵黄に用いることを考案した。血清中のリポタンパク質の凝集には、デキストランサルフェートの濃度や塩化カルシウムの添加量、pH等種々の因子が影響を与えると報告されている<sup>1)</sup>。そこで中井<sup>4)</sup>のスーパーシンプレックス・オブティマイゼーション法を用いて、デキストランサルフェート濃度、塩化カルシウム濃度、卵黄溶液のpH等を種々の条件に設定して、リポタンパク質の凝集沈殿の状況を検討するとともに、この沈殿からリン脂質を抽出する方法を検討したのでここにその結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 試料の調製

鶏卵は産卵直後の新鮮卵を用いた。割卵後、卵黄を蒸留水で数回洗浄し、大部分の卵白を除去した。次に卵黄を口紙上にころがし附着する卵白を完全にのぞいてから、ガーゼで口過し卵黄膜を除いた物を卵黄試料とした。デキストランサルフェートはシグマ社 (No D-6001) を用いた。

### 2. 卵黄からリポタンパク質の分離

中井<sup>4)</sup>のスーパーシンプレックス・オプティマイゼーション法を用い、卵黄にデキストランサルフェート等を加えた溶液を遠心分離した上層溶液のタンパク含量を最大にし、脂質含量を最低にするデキストランサルフェート濃度、塩化カルシウム濃度、pH等を求めればよいわけであるが、今回著者は上層溶液の脂質含量を最小にするオプティマイゼーション法を検討した。このために、デキストランサルフェートの濃度範囲を0.01~2.0%, 塩化カルシウム添加量を0.02~0.5M, pH7.3, 0.01Mリン酸緩衝液添加量を卵黄の2~4倍の範囲、溶液のpHを4~8とし、表1に示すような5種のベルテックスを設定した。次に卵黄10gを用いてこれらの条件に調整後、遠心分離して上層溶液を集め、その固形物量、脂質含量を次のように測定した。固形物は、上層溶液の一定量を採取し105°Cで蒸発乾固後精秤した。この重量から塩化カルシウム量をさしひいて固形物量とした。脂質は上層溶液5mlに2倍量のクロロホルム：メタノール=2：1混液を加え攪拌後、クロロホルム層を集めた。さらに同じ溶媒4mlで上層溶液を2回洗浄し、このクロロホルム層も合わせてから溶媒を加熱蒸発させ油脂の重量を測定した。次にトータルの上層液量に換算して、油脂の重量を算出した。

### 3. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、7.5%アクリルアミド含量で、スラブ型の垂直ゲルを用いた。泳動後クマーシーブリリアンドブ

ルーG250でタンパク質を染色した。

### 4. リポタンパク質画分から脂質の分離

卵黄にデキストランサルフェート等を添加後、遠心分離して得た沈殿を回収し、この沈殿に5倍量のクロロホルム：メタノール=2：1混液、ジエチルエーテル（以下エーテルと呼ぶ）またはエタノールを加えて脂質を抽出した。次に抽出溶媒を回収し、溶媒を蒸発させてから脂質の重量を測定した。

### 5. 薄層クロマトグラフィー

一次元法で、中性脂質の分離には、石油エーテル：エーテル：酢酸=90：10：1の展開溶媒を用いた。また発色には50%硫酸溶液を用い、噴霧後110°Cに加熱し発色させた。一方極性脂質の分離にはクロロホルム：メタノール：水=65：25：4の展開溶媒を用い、モリブデン酸アンモン—過塩素酸試薬を噴霧後、120°Cで20分間加熱し発色させた。また中性脂質と極性脂質の量比を求めるために、クロロホルム：メタノール：水=65：25：4で展開させた薄層を別にヨウ素蒸気中に入れ黄色に発色させてからリン脂質画分をまとめてかき取り、一方原点に残った中性脂質画分も別にかき取り、それぞれクロロホルム：メタノール=2：1混液を加えて脂質を抽出した。これらの各溶媒抽出液を口過後、加熱して溶媒を蒸発させ、それぞれの脂質の重量を測定した。

## 実験結果

### 1. 卵黄からリン脂質画分の分離

遠心分離前の卵黄溶液は、図1の写真Aのようであったが、ベルテックス2の溶液は遠心分離後写真Bのようになり、大部分が沈殿した。一方この上層溶液はうすい黄色で透明であった。しかし他のベルテックスの試料は、遠心分離後も上層溶液が混濁しており、リポタンパク質等がかなり上層溶液に含まれているように推測された。実際に各上層溶液の脂質含量と固形物含量を測定した結果は表2のようになり、ベルテックス2の条件では、上層溶液中の脂質含量は元の卵黄中の脂質の

表1. オプティマイゼーションの実験条件

ベルテックス No	リン酸緩衝液 添加量(倍)	pH	塩化カルシウム (M)	デキストラン サルフェート(%)
1	2.00	4.00	0.020	0.010
2	3.75	4.87	0.125	1.852
3	3.75	4.87	0.464	0.445
4	9.41	4.87	0.125	0.445
5	3.75	7.70	0.125	0.445

実際には、卵黄10gに、pH7.4、0.001Mリン酸緩衝液を上倍率で加え、0.1NHClまたは0.1NNaOHでpHを調整してから、この全液量を測定し、相当する塩化カルシウムとデキストランサルフェートを順次加えた。

表2. 遠心分離後の  
上層溶液の固形物含量と脂質含量

ベルテックス No	全固形物 (g)	脂質 (g)
1	4.238	1.985
2	0.148	0.001
3	3.342	1.931
4	0.071	0.027
5	3.100	1.741

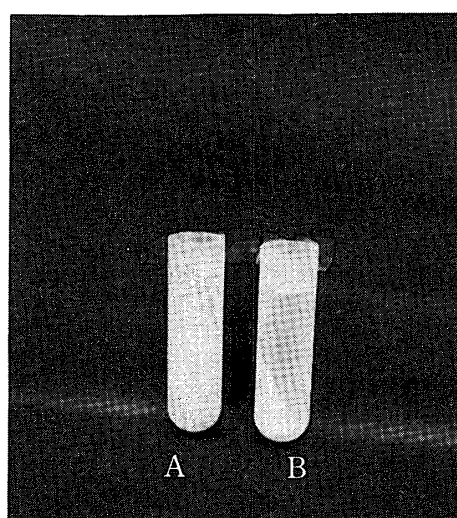


図1. 卵黄溶液と遠心分離後の  
ベルテックス2の卵黄溶液  
A: 卵黄溶液  
B: 遠心分離後のベルテックス2の  
卵黄溶液

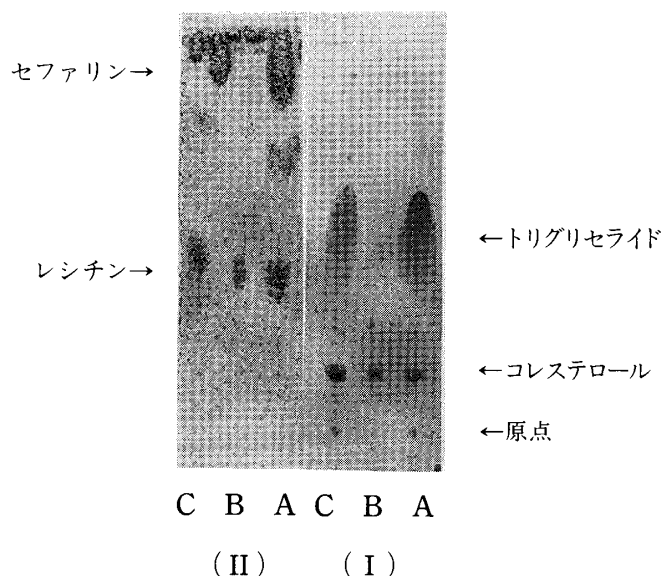


図3. 抽出脂質の薄層クロマトグラム

I: 中性脂質の分離 (石油エーテル: エーテル: 酢酸=90:10:1)

II: 極性脂質の分離 (クロロホルム: メタノール: 水=65:25:4)

(A: クロロホルム-メタノール抽出物)

(B: エーテル抽出物)

(C: エタノール抽出物)

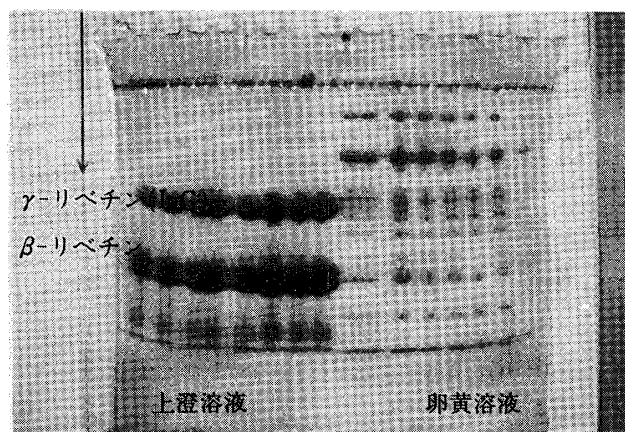


図2. 卵黄溶液と上澄溶液のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図

0.03%と非常に少なく、ほぼすべてのリポタンパク質が沈殿に含まれていることを示していた。一方卵黄溶液とベルテックス2の上層溶液のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果は、図2のようになり、ベルテックス2の上層溶液には、 $\gamma$ -リベチンを含むリベチン画分が主に含まれていることがわかった。卵黄には、この他のタンパク質としてホスビチンが含まれているが、ホスビチンはグラニュール中で高密度リポタンパク質(HDL)と結びついた形で含まれており<sup>8,9)</sup>、今回の操作でやはり、沈殿中に移行したものと思われた。

## 2. リポタンパク質画分から脂質の分離

ベルテックス2の沈殿にクロロホルム：メタノール＝2：1混液、エーテルまたはエタノールを加え抽出した脂質の量は、それぞれ沈殿の30.89%，15.42%，6.97%であった。これらの脂質の薄層クロマトグラムは図3のようになり、クロロホルム：メタノール＝2：1抽出物(IA)，エタノール抽出物(IC)では、トリグリセライドやコレステロールのスポットがはっきり表われていたが、エーテル抽出物(IB)では、トリグリセライドは少なめで、コレステロールのスポットがうすく表われていた。一方極性脂質の薄層クロマトグラムでは、エーテル抽出物(II B)に、レシチンが多く含まれていた。実際にエーテル抽出物の99.6%はリン脂質であり、この他に微量のトリグリセライドやコレステロールを含んでいることがわかった。八田ら<sup>3)</sup>はリン脂質を亜鉛で沈殿させ、これをさらにアセトンで洗浄し純化しているが、このような方法を利用すれば、今回のリン脂質フラクションに混在するトリグリセライドやコレステロールを除去することが可能と思われた。

## 要 約

1. 中井らのスーパーシンプレックス・オブティマイゼーション法を用い、卵黄溶液のpH、希釈倍数、塩化カルシウム添加量、デキストランサルフェート添加量を種々に調製した溶液を遠心分離したところ、pH4.87、リン酸緩衝液添加量3.75倍、塩化カルシウム濃度0.125M、デキストランサルフェート添加量1.852%の条件でほとんどのリポタンパク質が沈殿した。
2. 一方この上層溶液は $\gamma$ -リベチンに富むリベチン画分であった。
3. リポタンパク質沈殿のエーテル抽出物は、レシチンに富むフラクションであった。

## 文 献

- 1) BURNSTEIN, M. and SCHOLNICK, H.R. "Advances in Lipid Research". Academic Press, New York, Vol. 11, p. 67 (1972).
- 2) 富金原迪, 高野三雄, フレグランス・ジャーナル, **27**, 83 (1977).
- 3) HATTA, H., SIM, J. S. and NAKAI, S., J. Food Sci., **53**, 425 (1988).
- 4) NAKAI, S. "Practical computer-aided Optimization in Food Research and Processing." Elsevier Applied Science, Essex, O. K. (1988).
- 5) POLSON, A., WECHMAR, M. B. and FAZAKERLEY, G. Immunol. Commun. **9**, 495 (1980).
- 6) SZUHAJ, B. F., J. Amer. Oil Chem. Soc., **60**, 306 (1983).
- 7) 筒井知己, 日食工誌, **33**, 349 (1986).
- 8) TSUTSUI, T. and OBARA, T. Agric. Biol. Chem., **46**, 2587 (1982).
- 9) TSUTSUI, T. and OBARA, T. Agric. Biol. Chem., **48**, 1153 (1984).